



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0040483
(43) 공개일자 2011년04월20일

(51) Int. Cl.

A61L 27/36 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0097767

(22) 출원일자 2009년10월14일

심사청구일자 2009년10월14일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교

서울대학교산학협력단

서울 관악구 신림동 산 56-1

대한민국(관리부서:농촌진흥청장)

경기 수원시 권선구 서둔동 250

(72) 발명자

박찬흠

강원도 춘천시 퇴계동 주공 프란체아파트

1006-1003

박영환

서울특별시 강남구 개포동 654번지 현대2차아파트

211동 301호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

오용수, 배성호, 진수정, 정태훈

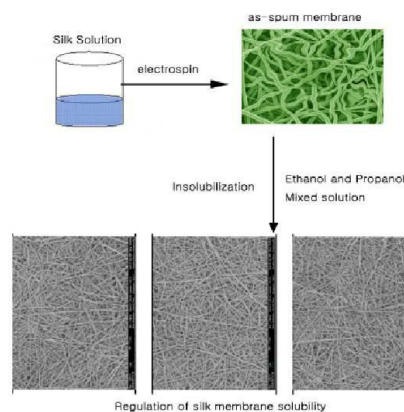
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 생분해성 실크 나노섬유 막 및 그 제조방법, 이를 이용한 생분해성 지지체

(57) 요약

본 발명은 실크 나노섬유 막의 생분해 속도를 조절하는 방법 및 그로부터 제조되는 실크 나노섬유 막에 대한 것이다. 보다 구체적으로 실크 나노섬유 막의 제조 공정 중, 방사된 섬유막을 불용화 처리하는 과정에서 생분해 속도를 조절할 수 있음을 발견하고 이를 제공하고자 한다. 본 발명에 의하면 실크 나노섬유 막의 생분해 속도를 향상시킬 수 있어 조직공학 분야에서 그 응용 범위를 확장할 수 있다. 즉, 본 발명은 실크 나노섬유 막으로부터 제조되는 생분해성 지지체를 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

기창석

경기도 평택시 비전2동 756-5번지

김종욱

대구광역시 동구 신암1동 신암뜨란채아파트 107동
1504호

권해용

경기도 수원시 영통구 망포동 망포마을현대2차아이
파크아파트 201-1601

이광길

경기도 수원시 권선구 탑동 42-1 우방아파트
105-203

강석우

경기도 화성시 반송동 79 우남퍼스트빌 350-1903

특허청구의 범위

청구항 1

섬유 방사 원액을 준비하는 공정, 전압을 가하면서 상기 준비된 섬유 방사 원액을 방사하는 공정, 상기 방사된 섬유를 알코올 용액에 침지시킨 후 재결정하는 불용화 처리 공정으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 실크 나노 섬유 막의 제조방법.

청구항 2

제1 항에 있어서,

상기 불용화 처리 공정에서 알코올 용액의 종류 및 혼합 비율을 조정함으로써 실크 나노섬유 막의 생분해 속도를 조절하는 것을 특징으로 하는 실크 나노섬유 막의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 알코올 용액은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 및 펜탄올로 이루어진 그룹에서 1종 또는 2종 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 실크 나노섬유 막의 제조방법.

청구항 4

방사된 섬유로부터 에탄올 및 프로판올의 혼합 용액에의 침지 및 재결정에 의해 생분해 속도가 조절된 것을 특징으로 하는 실크 나노섬유 막.

청구항 5

제 4항의 실크 나노섬유 막으로부터 제조되는 것을 특징으로 하는 생분해성 지지체.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 실크 나노섬유 막 및 그 제조방법에 관한 것이다. 특히, 생체 내에서 생분해 되는 특성을 지닌 실크 나노섬유 막의 제조방법을 제시한다.

배경 기술

[0002] 조직공학용 지지체는 천연 세포외기질과 유사한 다공성 구조로 지지체에 배양된 세포-지지체 복합체의 제조에 사용된다. 환자의 몸에서 필요한 조직을 채취하고 그 조직으로부터 세포를 분리한 다음 분리된 세포를 지지체에 배양하여 세포-지지체 복합체를 제조한 후 이를 다시 인체 내에 이식하는 조직공학 기술에서는 생체조직 또는 장기의 재생을 최적화하기 위하여 생체조직과 유사한 지지체를 제조하는 것이 관건이다.

[0003] 이러한 지지체는 조직세포가 지지체에 유착하여 3차원적 구조를 가진 조직을 형성할 수 있는 틀로서 작용하며, 생체에 이식된 후에는 혈액응고나 염증반응이 일어나지 않는 무독성이어야 한다(생체적합성).

[0004] 최근에는 세포 배양시 우수한 세포 부착능을 실현하기 위하여 다공성 구조의 지지체를 제조하는 기술로서 입자 침출법 (particulate leaching), 유화동결 건조법(emulsion freeze-drying), 고압기체 팽창법 (high pressure

gas expansion) 및 상분리법 (phase separation) 등이 개발되었다.

- [0005] 입자 침출법은 유기용매에 생체적합성이 우수한 고분자를 용해시킨 후 그 용액에 녹지 않는 소금 등의 입자를 혼합하여 주물을 제조한 후 용매를 제거하고 물을 이용하여 소금 입자를 용출하여 제거하는 방법이다. 입자침출법은 공극을 형성하는 과정에서 잔존하는 소금염이나 그것의 거친 형상으로 인해 세포가 손상될 염려가 있다.
- [0006] 유화동결 건조법은 생체적합한 고분자를 유기용매에 용해시킨 용액 및 물의 유화액을 동결건조하여 유기용매와 물을 제거함으로써 공극을 형성시키는 과정에서 공극(open cellular pores)를 만드는데 한계가 있다.
- [0007] 이것은 생체적합한 고분자를 주형에 넣고 압력을 가해 펠렛을 만들고 적당한 온도에서 고압의 가스를 펠렛에 주입한 다음 서서히 압력을 낮추어 가스가 방출되도록 하여 공극을 형성시키는 과정에서도 마찬가지이다.
- [0008] 상분리법은 생체적합한 고분자를 유기용매에 용해시킨 용액에 승화성 물질 또는 용해도가 다른 용매를 추가하고 승화 또는 온도변화에 따른 용액의 상분리에 의해 공극을 형성하는 방법이나, 이때에는 공극의 크기가 너무 작다는 문제가 있다.
- [0009] 한편, 대한민국 등록특허 10-0751547에서는 천연 세포외 기질과 유사한 다공성 구조의 지지체를 제조하는 방법으로서, 섬유 방사원액을 전기 방사를 통해서 3차원 구조의 스펀지 형태의 실크나노섬유로 이루어진 지지체를 제조하는 방법을 제시하였다.
- [0010] 또한, 대한민국 공개특허 10-2009-0041271호에서는 조직공학용 나노섬유 지지체의 공극 구조 조절 방법으로서, 나노 섬유 분산체 용액에 불용인 공극 형성용 입자를 포함하는 혼합물로부터 3차원 구조를 가지며 공극도가 90% 이상인 나노 섬유로 이루어진 나노 섬유 지지체(scaffold)를 형성하는 방법을 제시하였다.
- [0011] 상기 실크 나노섬유 지지체는 나노 수준의 단백질 섬유가 얹혀있는 3차원 구조의 천연 세포외기질과 유사한 구조로서 비표면적이 크고 공극율을 극대화 시킨 것이다. 그러나, 실크 나노섬유 지지체는 생체 이식용 소재로 사용하기에 많은 장점을 지니고 있음에도 불구하고 PLGA와 같은 생분해성 합성고분자와 달리 생분해 속도를 조절할 수 없는 단점이 있다. 이와 같은 실크 나노섬유의 한정된 생분해성은 실크 나노섬유 막을 다양한 활용 분야, 특히 조직공학용으로 적용하기에 제약을 초래한다.
- [0012] 실크 나노섬유 막의 한정된 생분해성은 기존에 널리 이용되고 있는 재생 실크 단백질의 재결정화 방법의 한계에 기인한다. 재결정화(불용화)에는 주로 메탄올이나 에탄올에 침지하는 방법을 이용하는데 이 방법으로는 결정화 정도를 조절하기 어렵다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0013] 본 발명은 전술한 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 실크 나노섬유 막의 생분해성 조절 방법을 제공하고자 한다. 또한, 본 발명은 생분해성 조절이 용이한 실크 나노섬유 막을 제공하고자 한다. 마지막으로, 본 발명은 조직공학 기술에서 다양한 용도로 사용될 수 있는 생분해성 지지체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

- [0014] 본 발명은 섬유 방사 원액을 준비하는 공정, 전압을 가하면서 상기 준비된 섬유 방사 원액을 방사하는 공정, 상기 방사된 섬유를 알코올 용액에 침지시킨 후 재결정하는 불용화 처리 공정으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 실크 나노섬유 막의 제조방법을 제공한다.
- [0015] 상기 불용화 처리 공정에서는 알코올 용액의 종류 및 혼합 비율을 조정함으로써 실크 나노섬유 막의 생분해 속도를 조절한다.
- [0016] 바람직하게, 상기 알코올 용액은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 및 펜탄올로 이루어진 그룹에서 1종 또는 2종 이상 선택될 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명은 방사된 섬유로부터 에탄올 및 프로판올의 혼합 용액에의 침지 및 재결정에 의해 생분해 속도가 조절된 것을 특징으로 하는 실크 나노섬유 막을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 실크 나노섬유 막으로부터 제조되는 것을 특징으로 하는 생분해성 지지체를 제공한다.

효 과

[0019] 이상에서 설명한 바와 같은 본 발명의 제조방법에 의하면 실크 나노섬유 막의 생분해 속도를 조절할 수 있다. 따라서, 용도에 따라 적당한 생분해 속도를 가지는 실크 나노섬유 막의 제조가 가능하다. 그러므로, 본 발명의 실크 나노섬유 막은 조직공학용 지지체로서 다양하게 활용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0020] 실크 나노섬유 막은 실크 피브로인(실크 단백질)을 재생하여 생성되는 직경 100~400 nm의 섬유가 불규칙하게 망상 구조로 배열된 일종의 부직포이다. 실크 나노섬유 막의 두께는 자유롭게 조절 가능하나 통상 50~200 μm 의 것이 사용된다. 또한 섬유가 얽혀있는 구조이기 때문에 70~80%의 높은 공극도를 나타낸다. 상기 공극의 크기는 대략 1 μm 이다. 결정화된 실크 나노섬유 막은 건조 상태에서는 부서지기 쉬우나, 물에 젖은 상태에서는 유연하여 다루기가 용이하고, 변형이 가능하다.

[0021] 실크 나노섬유 막은 일반적으로 전기방사법을 이용하여 제조된다. 본 발명에서는 상기 전기방사법에서 실크 나노섬유 막의 생분해성을 조절하는 방법을 제시한다. 구체적으로 실크 나노섬유 막의 제조방법은 하기와 같다.

[0022] 1) 섬유 방사 원액의 제조

[0023] 실크 나노섬유 막은 실크 섬유로부터 제조된다. 실크 섬유는 누에고치로부터 뽑아낸 실로 만든 섬유로서 두 가지의 피브로인이 세리신 외막에 싸여 있는 구조이다. 피브로인은 생체친화성이 우수하여 주변의 어떤 조직에도 영향을 미치지 않기 때문에 분말, 겔, 수용액 등 여러 형태로 제조되어 식품, 의약품 등에 다양하게 사용될 수 있다. 따라서, 실크 섬유를 이용하기 위해서는 외막의 세리신을 제거하는 것이 바람직하다. 세리신을 제거한 후에는 수세, 건조, 투석을 통하여 실크 피브로인 수용액을 제조하고, 실크 피브로인 수용액을 동결건조하여 실크 피브로인 스펀지를 제조한다. 그리고, 이것을 용매에 용해시켜 섬유의 방사 원액을 제조한다.

[0024] 구체적으로, 나노 섬유 원액의 제조를 위해 누에고치를 마르세유비누와 탄산나트륨 수용액에 넣고 100℃의 온도에서 1시간 정도 처리한 후 증류수로 반복 수세함으로써 세리신을 제거한다. 다음으로, 상기 고치를 완전 건조시킨 후 염화칼슘/물/에탄올 혼합용매에 완전히 용해시키고 셀룰로오스 투석막으로 투석시켜 염 및 에탄올을 제거한다. 최종적으로 생성된 실크 피브로인 수용액을 동결건조하여 스펀지 형태로 제조한다. 상기 스펀지 형태의 실크 피브로인을 98%의 개미산에 용해하고 불순물 및 기포를 제거하여 나노 섬유 원액을 제조한다.

[0025] 2) 나노섬유 막의 제조

[0026] 상기 섬유 원액으로부터의 방사는 10~20 kV의 전압을 가하면서 이루어진다.

[0027] 구체적으로, 나노 섬유 원액을 주사기에 담고 송출펌프를 이용하여 0.2~0.5ml/hr의 속도로 토출한다. 이때 주사기 바늘에 전극을 연결하여 직류전원장치로 상기 범위의 정전압을 가한다. 형성된 실크 나노 섬유는 회전형 드럼 표면에 수집한다.

[0028] 3) 나노섬유 막의 불용화 처리

[0029] 전기 방사 직후의 나노섬유는 강도가 약하고 습기에 매우 취약하므로 불용화 처리 공정을 거친다. 불용화 처리는 방사된 나노섬유를 알코올에 침지하고 재결정화하는 것이다. 이러한 불용화 처리 과정에서 나노섬유 막의 생분해성을 조절할 수 있다. 본 발명에서는 나노섬유를 다양한 종류의 알코올 용액에서 재결정화시킨 후 생분해 속도를 측정하였다. 알코올 용액의 종류 및 혼합비율을 조절하면서 실크 나노섬유의 성분 변화를 측정하였고, 아울러 제조된 실크 나노섬유막의 생분해 거동을 관찰하였다.

[0030] 본 발명에서 불용화 처리 공정에 사용하는 알코올 용액은 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 부탄올(butanol), 펜탄올(pentanol)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 또는 2종 이상을 조합하여 사용할 수 있다.

[0031] 상기 알코올 용액의 종류에 따라 섬유의 사용 목적에 맞는 바람직한 생분해 속도를 지니는 실크 나노섬유의 제조가 가능하다. 따라서, 본 발명에서는 실크 나노섬유 막의 불용화 처리 공정에 의해 생분해 속도를 조절하는

방법을 제공한다.

[0032] 바람직하게, 본 발명에서는 에탄올과 프로판올의 혼합 알코올 용액을 사용한다. 상기 혼합 알코올 용액의 혼합 비율은 에탄올 기준, 부피비 0-100%의 범위이다. 에탄올의 함량이 높아질수록 나노섬유 내 베타구조의 함량이 높아지고, 그에 따라 용해성이 감소하여 생분해 속도는 느려진다. 반면, 프로판올을 사용할 경우에는 불용화 처리 동안 섬유 내 베타구조의 함량 증가가 크지 않아, 처리 전 후를 비교할 때 거의 비슷한 수준으로 유지된다. 그러나, 수분에 대한 안정성은 증가하므로 나노섬유의 강도가 강해지고 내습성이 향상된다. 한편, 생분해 속도는 에탄올 처리시와 비교할 때 빠른 것으로 나타난다.

[0033] 실크 나노섬유 막의 재결정화 처리는 전기방사 종료 후 집적장치인 드럼 표면에서 나노섬유 막을 떼어내어 알코올 용액에 1시간 동안 침지하고, 수축을 방지하기 위해 압력하에서 건조하는 것으로 이루어진다.

[0034] 이하 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명이 이에 한정되는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0035] 실시예

[0036] 1) 전기방사용 방사원액 준비

[0037] 가잠 고치를 마르세유비누와 탄산나트륨을 각각 0.3% 및 0.2%로 용해한 수용액에 욕비 1:25의 비율로 넣어 100℃에서 1시간 동안 처리 후 증류수를 이용하여 반복 수세하여 세리신을 제거하였다. 다음, 정련된 고치를 완전히 건조하고 염화칼슘/물/에탄올(몰비: 1:8:2) 혼합용매를 이용하여 욕비 1:20으로 85℃에서 완전히 용해시키고 셀룰로오스 투석막을 이용하여 증류수에 3일간 투석하여 염 및 에탄올을 제거하였다. 최종 과정으로 제조된 실크 피브로인 수용액은 동결 건조하여 스펀지 형태로 얻었다.

[0038] 나노 섬유 원액은 제조된 실크 피브로인 스펀지를 98%의 개미산에 농도 12%로 완전히 용해하고 불순물 및 기포를 제거함으로써 준비하였다.

[0039] 2) 나노섬유 막 제조를 위한 전기방사

[0040] 전기방사를 이용하여 나노섬유 막을 제조하기 위해 상기에서 제조된 방사원액을 주사기에 담고 송출펌프를 이용하여 0.2-0.5 ml/hr의 속도로 토출하였다. 주사기 바늘에 전극을 연결하여 직류전원장치로 10 kV(+)의 정전압을 가하였다. 형성된 실크 나노섬유는 지름 14 cm의 회전형 드럼 표면에 수집하였다.

[0041] 3) 실크 나노섬유 막의 불용화 처리

[0042] 전기방사된 상기 실크 나노섬유 막(as-spun)의 불용화 처리에 사용하는 에탄올(ethyl alcohol: E)/프로판올(1-propanol: P) 혼합 용액의 혼합 비율을 E/P = 100/0, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50, 0/100로 다양하게 준비하였다. 각 용액에 전기방사된 실크 나노섬유 막을 1시간 동안 침지한 후 장력 하에서 건조하였다.

[0043] 다음으로, 제조된 각각의 실크 나노섬유 막의 베타 구조 함량 및 생분해 속도를 측정하였다.

[0044] 4) 베타 구조 함량

[0045] 재결정화 처리과정에 사용된 용액의 혼합 비율에 따라 실크 피브로인은 다양한 베타 구조 함량을 나타냄을 알 수 있다.(도2a 내지 2d) 실크 피브로인의 베타 구조는 불용화에 있어서 매우 중요한 구조적 특징으로써 일반적으로 베타 구조 함량이 높을수록 용해성이 감소한다.

[0046] 하기 표1은 재결정화 처리과정에 사용된 용액의 혼합 비율에 따른 실크 피브로인의 베타 구조 함량을 시간의 경과에 따라 나타낸 것이다.

표 1

Table. β and random coil conformation contents of SF nanofiber nonwoven mat in enzyme condition with various time (R=random coil conformation)

	1 week		2 week		3 week	
	β (%)	R(%)	β (%)	R(%)	β (%)	R(%)
EP100	77	14	86	8	77	11
EP802	76	12	73	15	79	10
EP604	79	10	75	13	83	7
EP505	77	14	76	14	11	87
EP010	N/A					

[0047]

[0048]

재결정화 처리 과정에서 사용한 용액 중 에탄올의 함량이 높을수록 실크 피브로인의 베타 구조 함량이 높게 나타났다. 반면, 프로판올을 단독으로 사용하여 재결정화 처리를 한 경우에는 재결정화 처리를 하지 않은 실크 피브로인의 베타 구조 함량과 차이를 나타내지 못하였지만, 수분에 대한 안정성은 증가하여 충분히 불용화 되었음을 확인하였다.

[0049]

5) 생분해 속도

[0050]

상기와 같은 재결정화 방법에 따라 제조된 실크 나노섬유 막의 단백질 가수분해 효소(proteinase K)에 의한 생분해 거동을 관찰하였다. 도3은 재결정화 처리에 사용된 용액의 혼합 비율에 따른 실크 나노섬유 막의 단백질 가수 분해 효소에 의한 질량 변화를 나타낸 것이다. 또한, 도 4는 Invitro 상에서의 생분해 결과를 보여주는 SEM 사진이다.

[0051]

실크 나노섬유 막의 질량 감소 및 생분해 정도는 프로판올의 함량이 높을수록 크게 나타났다. 즉 베타 구조의 함량이 낮을수록 생분해 속도가 증가함을 알 수 있다. 따라서 본 발명의 재결정화에 의한 생분해성 조절이 유효함을 알 수 있다.

[0052]

6) 생체내 생분해 속도(흡수율)

[0053]

본 발명의 방법으로 rat의 진피하 삽입후 실험 사진으로 육안적으로 실크 재결정화 처리과정에 사용된 용액의 혼합 비율에 따라 생체내 실크막의 흡수율의 차이를 나타냄을 알수 있다(도5).

[0054]

3주일 경과 후의 실크 나노섬유 막을 주사 전자현미경으로 촬영한 것이다. 이를 비교하면, 조직 삽입 경과 후에 섬유질의 두께가 줄어든 것을 확인할 수 있다(도6).

[0055]

도7에서 처럼 실크 나노섬유 막의 측면 부위에서 생분해가 활발히 일어나는 것을 볼 수 있으며 재결정화 처리 과정에 사용된 용액의 혼합 비율에 따라 섬유의 두께가 줄어든 것을 확인할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0056]

도 1는 본 발명의 방사형 실크 나노섬유 막의 생분해 속도 조절 과정을 도시한 것이다.

[0057]

도2a 내지 2d는 재결정화 처리에 사용된 용액의 혼합 비율에 따른 실크 나노섬유의 베타 구조 함량 차이를 나타낸 것이다.

[0058]

도 3은 재결정화 처리과정에 사용된 용액의 혼합 비율에 따른 실크 나노섬유 막의 단백질 가수 분해 효소에 의한 질량 변화를 나타낸 것이다.

[0059]

도 4는 SEM 사진으로 재결정화 처리과정에 사용된 용액의 혼합 비율에 따른 실크 나노섬유 막의 Invitro 상에서의 생분해 결과를 나타낸 것이다.

[0060]

도 5는 육안적으로 재결정화 처리과정에 사용된 용액의 혼합 비율에 따라 생체내 실크 나노섬유 막의 흡수율의 차이를 나타낸 것이다. (E100: ethanol 100%, EP50: ethanol 50% + propanol 50%, P100: propanol 100%)

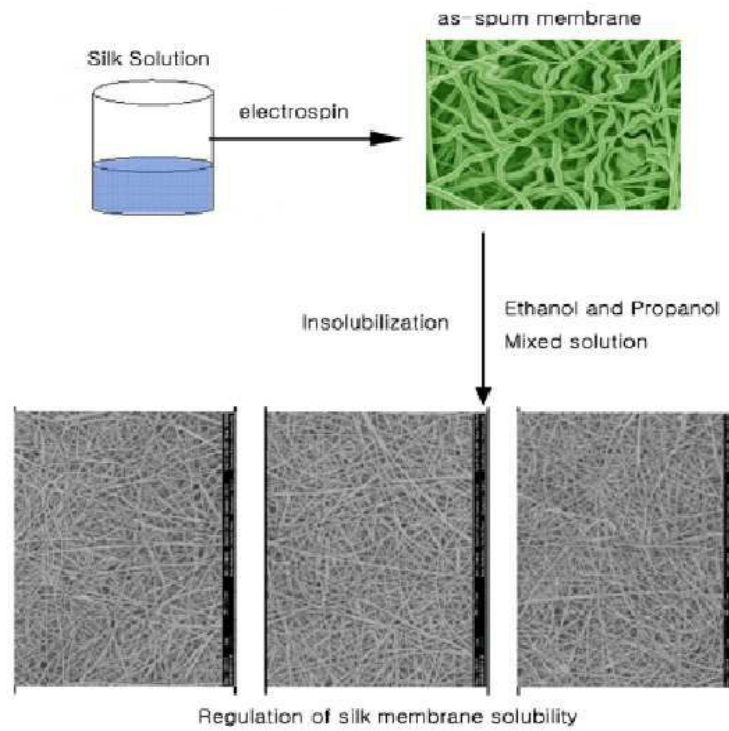
[0061]

도 6은 SEM 사진으로 재결정화 처리과정에 사용된 용액의 혼합 비율에 따라 생체내 실크 나노섬유 막의 흡수율의 차이를 나타낸 것이다.

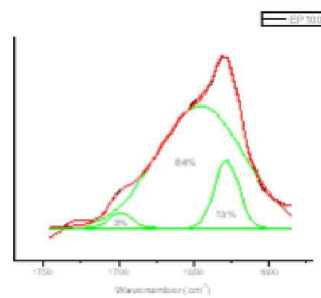
[0062] 도 7은 Masson trichrome stain으로 재결정화 처리과정에 사용된 용액의 혼합 비율에 따라 생체내 실크 나노섬유 막의 흡수된 두께의 변화를 나타낸 것이다.(좌로부터 각각 Ethanol 100%, Ethanol 50% + Propanol 50%, Propanol 100%의 데이터이다.)

도면

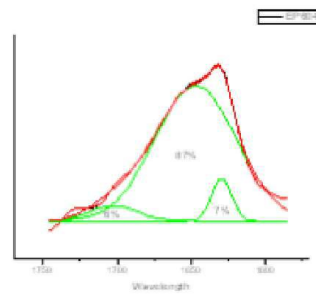
도면1



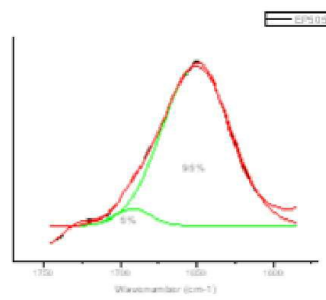
도면2a



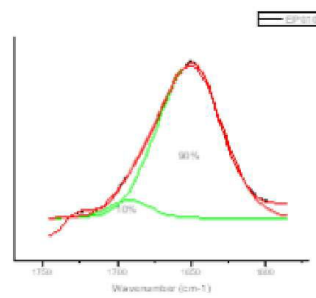
도면2b



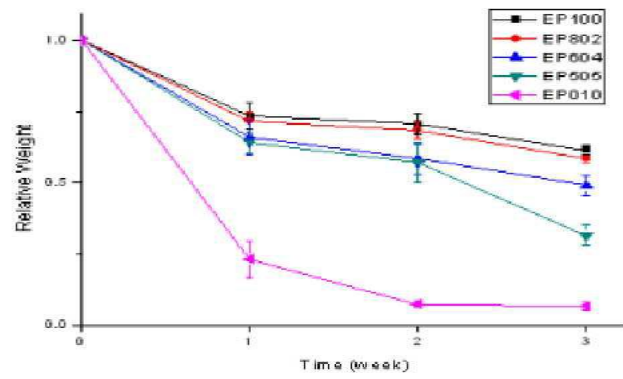
도면2c



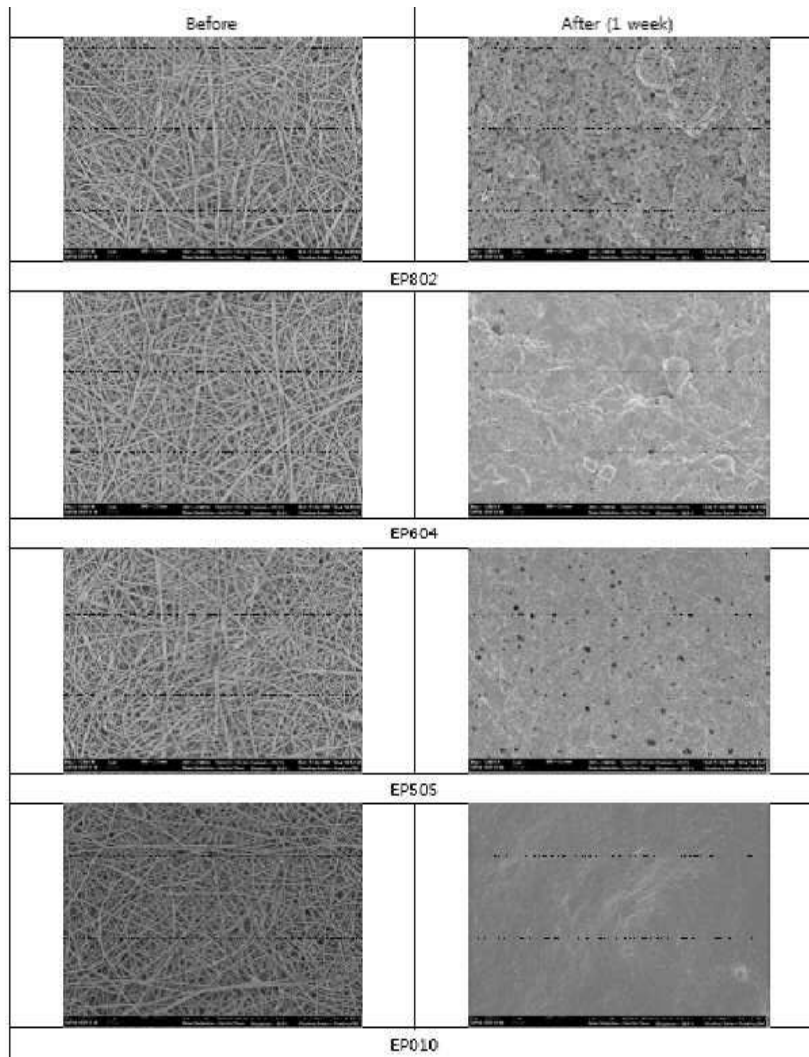
도면2d



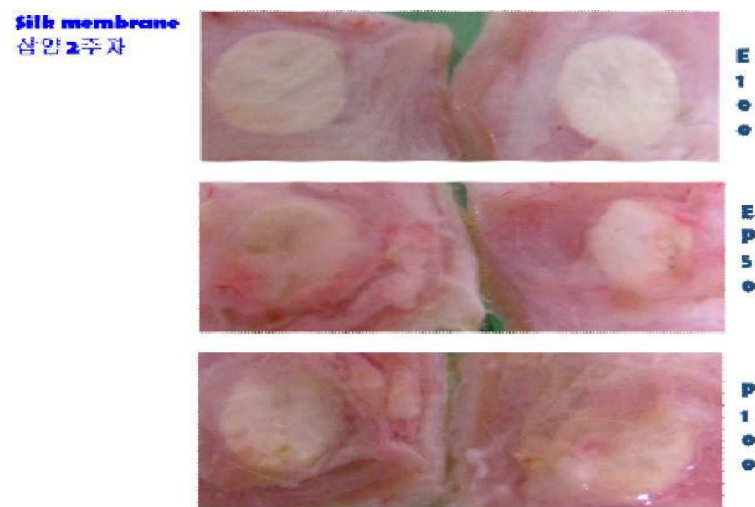
도면3



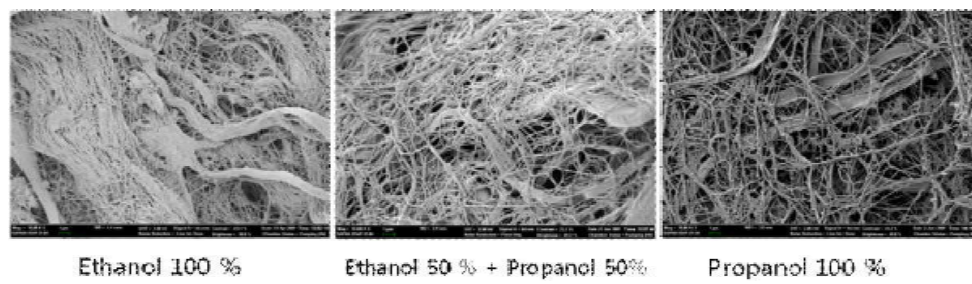
도면4



도면5



도면6



도면7

